

Дифференциация ишемии и артефактов в миокарде с помощью фотолиза никотинамидадениндинуклеотида

М.М. Слотвицкий^{1,2,3}, Г.С. Пашинцев^{1,2}, М.С. Медведев^{1,2}, В.С. Качан^{1,2}, В.Д. Джабраилов^{2,3},
К.И. Агладзе^{2,3}, В.А. Цвеляя^{1,2,3}

Для корреспонденции: Михаил Михайлович Слотвицкий, slotvitsky.mm@gmail.com, Валерия Александровна Цвеляя, yts93@yandex.ru

Поступила в редакцию 11 ноября 2025 г. Исправлена 27 ноября 2025 г. Принята к печати 2 декабря 2025 г.

Цитировать: Слотвицкий М.М., Пашинцев Г.С., Медведев М.С., Качан В.С., Джабраилов В.Д., Агладзе К.И., Цвеляя В.А. Дифференциация ишемии и артефактов в миокарде с помощью фотолиза никотинамидадениндинуклеотида. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2025;29(4):44-53. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2025-4-44-53>

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (исследовательский грант № 24-21-00162).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн работы: М.М. Слотвицкий, К.И. Агладзе, В.А. Цвеляя
Сбор и анализ данных: Г.С. Пашинцев, М.С. Медведев, В.С. Качан
Статистическая обработка данных: М.М. Слотвицкий, Г.С. Пашинцев, М.С. Медведев
Написание статьи: М.М. Слотвицкий, В.С. Качан, В.Д. Джабраилов
Исправление статьи: К.И. Агладзе, В.А. Цвеляя
Утверждение окончательного варианта статьи: все авторы

ORCID

М.М. Слотвицкий, <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>
Г.С. Пашинцев, <https://orcid.org/0009-0004-3377-1618>
М.С. Медведев, <https://orcid.org/0009-0004-8932-9773>
В.С. Качан, <https://orcid.org/0009-0004-1599-6119>
В.Д. Джабраилов, <https://orcid.org/0009-0004-7154-386X>
К.И. Агладзе, <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>
В.А. Цвеляя, <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>

© Слотвицкий М.М., Пашинцев Г.С., Медведев М.С., Качан В.С., Джабраилов В.Д., Агладзе К.И., Цвеляя В.А., 2025



¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Российская Федерация

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Визуализация флуоресценции никотинамидадениндинуклеотида в восстановленной форме является перспективным методом для оценки метаболического статуса миокарда при ишемии. Однако его широкому клиническому применению препятствует принципиальная неоднозначность интерпретации сигнала, который зависит как от метаболической концентрации этого кофермента, так и от условий освещения, что не позволяет надежно отличить ишемию от технических артефактов.

Цель. Разработать и валидировать метод однозначной интерпретации сигнала флуоресценции для дифференциации ишемии и артефактов на основе комбинированного анализа интенсивности флуоресценции и скорости фотолиза никотинамидадениндинуклеотида.

Методы. Проведена серия экспериментов на изолированных сердцах крыс ($n = 8$), перфузируемых по Лангендорфу. В четырех экспериментах моделировали ишемию (остановка перфузии), в других четырех – технический артефакт (изменение мощности и положения ультрафиолетового источника). Для каждой пары записей до и после вмешательства оценивали относительное изменение интенсивности флуоресценции (dF) и скорости фотолиза (dN), вычисленной путем аппроксимации кинетики математической моделью. Первичной конечной точкой была точность классификации типа вмешательства на основе совместного анализа dF и dN .

Результаты. При индуцированной ишемии наблюдалось значимое увеличение dF (294 ± 89 у.е.) при отсутствии изменения dN ($1,31 \pm 1,17$ у.е., $p > 0,05$). В случае артефакта также регистрировался рост dF (289 ± 83 у.е.), но сопровождавшийся значимым увеличением dN ($17,46 \pm 5,25$ у.е., $p < 0,01$). Совокупный анализ dF и dN позволил безошибочно классифицировать технические артефакты на всей тестовой выборке ($n = 8$).

Заключение. Комбинированный анализ флуоресценции и фотолиза никотинамидадениндинуклеотида позволяет устранить неоднозначность интерпретации сигнала и надежно дифференцировать ишемию миокарда от технических артефактов. Предложенный метод, не требующий референсной записи и длительного сканирования, может помочь внедрению метаболической визуализации в интраоперационный мониторинг и оценку жизнеспособности трансплантата.

Ключевые слова: ишемия миокарда; метаболический мониторинг; оптическая визуализация; никотинамидадениндинуклеотид; сердце; флуоресценция; фотолиз

NADH fluorescence and photolysis indices for differentiating myocardial ischemia from artifacts

Mikhail M. Slotvitsky^{1,2,3}, Georgy S. Pashintsev^{1,2}, Mikhail S. Medvedev^{1,2}, Valeriya S. Kachan^{1,2}, Vitalii D. Dzhabrailov^{2,3}, Konstantin I. Agladze^{2,3}, Valeriya A. Tsvelaya^{1,2,3}

Corresponding author: Mikhail M. Slotvitsky, slotvitsky.mm@gmail.com, Valeriya A. Tsvelaya, vts93@yandex.ru

Received 11 November 2025. Revised 27 November 2025. Accepted 2 December 2025.

How to cite: Slotvitsky M.M., Pashintsev G.S., Medvedev M.S., Kachan V.S., Dzhabrailov V.D., Agladze K.I., Tsvelaya V.A. NADH fluorescence and photolysis indices for differentiating myocardial ischemia from artifacts. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2025;29(4):44-53. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2025-4-44-53>

Informed consent

The patient's informed consent to use the records for medical purposes is obtained.

Funding

The work was supported by the Russian Science Foundation (Research Grant No. 24-21-00162).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Contribution of the authors

Conception and study design: M.M. Slotvitsky, K.I. Agladze, V.A. Tsvelaya
Data collection and analysis: G.S. Pashintsev, M.S. Medvedev, V.S. Kachan
Statistical analysis: M.M. Slotvitsky, G.S. Pashintsev, M.S. Medvedev
Drafting the article: M.M. Slotvitsky, V.S. Kachan, V.D. Dzhabrailov
Critical revision of the article: K.I. Agladze, V.A. Tsvelaya
Final approval of the version to be published: M.M. Slotvitsky, G.S. Pashintsev, M.S. Medvedev, V.S. Kachan, V.D. Dzhabrailov, K.I. Agladze, V.A. Tsvelaya

ORCID

M.M. Slotvitsky, <https://orcid.org/0000-0003-2237-4217>
G.S. Pashintsev, <https://orcid.org/0009-0004-3377-1618>
M.S. Medvedev, <https://orcid.org/0009-0004-8932-9773>
V.S. Kachan, <https://orcid.org/0009-0004-1599-6119>
V.D. Dzhabrailov, <https://orcid.org/0009-0004-7154-386X>
K.I. Agladze, <https://orcid.org/0000-0002-9258-436X>
V.A. Tsvelaya, <https://orcid.org/0000-0002-3554-9736>

© 2025 Slotvitsky et al.



¹ ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudnyi, Russian Federation

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract

Background: Visualization of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence is a promising method for assessing the metabolic status of the myocardium during ischemia. However, its widespread clinical application is hindered by the fundamental ambiguity in signal interpretation, as it depends both on the metabolic concentration of this coenzyme and the illumination conditions that prevents reliable distinction of ischemia state from technical artifacts.

Objective: The study was aimed to develop and validate a method for unambiguous interpretation of the fluorescence signal to differentiate ischemia from artifacts, based on the combined analysis of fluorescence intensity and the rate of NADH photolysis.

Methods: A series of experiments was conducted on isolated rat hearts ($n = 8$) perfused using the Langendorff technique. In 4 experiments, ischemia was modeled due to cessation of perfusion; in the other 4 cases, a technical artifact was induced by change in power and position of the ultraviolet source. For each pair of recordings, namely before and after intervention, the relative changes in fluorescence intensity (dF) and the rate of photolysis (dN), calculated by approximating the kinetics with a mathematical model, were assessed. The primary endpoint was the accuracy of classifying the intervention type based on the combined analysis of dF and dN .

Results: In induced ischemia, a significant increase in dF (294 ± 89 a.u.) was revealed with no change in dN (1.31 ± 1.17 a.u., $p > 0.05$). In the case of the artifact assessing, an increase in dF was also recorded (289 ± 83 a.u.) but it was accompanied by a significant increment in dN (17.46 ± 5.25 a.u., $p < 0.01$). The combined analysis of dF and dN enabled to accurately classify technical artifacts across the entire test sample ($n = 8$).

Conclusion: The combined analysis of NADH fluorescence and photolysis eliminates signal interpretation ambiguity and reliably differentiates myocardial ischemia state from technical artifacts. The proposed method, which does not require a reference recording or prolonged scanning, could facilitate the adoption of metabolic imaging to intraoperative monitoring and the assessment of graft viability.

Keywords: fluorescence; heart; monitoring; myocardial ischemia; optical imaging; NAD; photolysis

Введение

Нарушение энергетического обмена клеток является характерной чертой множества хронических заболеваний, включая рак, диабет, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые патологии [1–4], а также острых состояний, таких как ишемия и аноксия [5; 6]. Возможность прямой визуализации нарушения энергетического обмена могла бы стать ценным инструментом для оценки жизнеспособности миокарда и маркировки зон ишемического повреждения. Одним из наиболее перспективных подходов визуализации является регистрация флуоресценции молекул никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) в восстановленной форме, вызванная ближним ультрафиолетовым (УФ) излучением (365 нм) [7]. НАДН – ключевой поставщик электронов в митохондриальную дыхательную цепь, обладающий свойством автофлуоресценции в видимом диапазоне света. Активная роль НАДН в клеточном дыхании, где он окисляется обратно в окисленную форму НАДН – НАД⁺ [8; 9], делает его естественным индикатором гипоксии: при недостатке кислорода цепь переноса электронов угнетается, НАДН накапливается, что регистрируется как рост интенсивности флуоресценции НАДН (фНАДН) [10; 11]. Это свойство легло в основу оптического картирования для визуализации метаболической гетерогенности в миокарде [12–15]. Наибольший практический интерес представляют два направления: оценка жизнеспособности сердца после ишемии и реперфузии [16; 17], оценка регионов абляции [18].

Однако широкому внедрению фНАДН-визуализации в хирургическую практику препятствует фундаментальное ограничение – неоднозначность интерпретации сигнала. Интенсивность сигнала фНАДН в равной степени зависит как от концентрации НАДН (связано с метаболизмом), так и от поступления фотонов возбуждающего излучения (не связано с метаболизмом). Таким образом, небольшое смещение ткани или источника излучения может повлиять на сигнал в той же степени, что и изменение концентрации НАДН (рост которой, как правило, ограничен 10 % [19]), что делает интерпретацию изменений фНАДН неоднозначной, затрудняя принятие решений. На данный момент существуют два частных случая решения этой проблемы: 1) полная фиксация условий эксперимента и запись контрольного состояния ткани при минимальной концентрации НАДН (достигнутая либо настройкой перфузии [11–13], либо фармакологической остановкой окислительного фосфорилирования [16; 20]); 2) применение специальных катетеров для сканирования поверхности сердца [16–18]. Первый

подход в интраоперационных условиях неприменим: хирургическое вмешательство приведет к изменению положения органа относительно источника излучения и камеры, фармакологическая остановка окислительного фосфорилирования недопустима, что делает невозможным получение референсной записи для интерпретации изменений фНАДН. Второй подход требует длительного сканирования (порядка 2 мин на анализ 7 мм², как указано в [16]), тогда полное сканирование займет время, неприемлемое для оперативной помощи в принятии хирургических решений.

Для решения данной проблемы мы предлагаем дополнительный метод интерпретации фНАДН, основанный на сопутствующем химическом процессе – фотолизе НАДН до НАД⁺. Известно, что под действием возбуждающего излучения 365 нм происходит не только флуоресценция НАДН, но и фотолиз, продуктом которого является НАД⁺ [21]. Такой переход сдвигает баланс НАДН/НАД⁺, который далее восстанавливается митохондриальными ферментами [21; 22]. Таким образом, фотолиз НАДН является обратимым в метаболически активной ткани и может быть использован для анализа тканей наряду с флуоресценцией. Наш подход строится на использовании математической модели баланса НАДН/НАД⁺ [23], которую мы используем для оценки скорости фотолиза (N). В отличие от интенсивности фНАДН, значение N зависит только от поступления фотонов возбуждающего излучения и не зависит от концентрации НАДН (согласно математической модели, валидированной в [23]). На этом строится основная гипотеза: совокупный анализ интенсивности фНАДН и скорости фотолиза N позволит однозначно интерпретировать изменение фНАДН в экспериментах на изолированном сердце крысы при перфузии по Лангендорфу.

Для проверки данной гипотезы была проведена серия экспериментов на изолированных сердцах: в каждом эксперименте менялась либо концентрация НАДН за счет кратковременной остановки перфузии, либо количество УФ-фотонов, поступающих на поверхность сердца. В каждой паре записей (до и после вариации НАДН или количества фотонов) оценивалось относительное изменение интенсивности фНАДН (dF) и относительное изменение скорости фотолиза (dN). Для вычисления dN использовалась математическая модель баланса НАДН/НАД⁺ [23] при фотолизе, а для вычисления dF использовались абсолютные значения фНАДН в начальный момент записи (аналогично классическим исследованиям [11–13]). Сравнение и сопоставление двух методов позволило проверить начальную гипотезу и указать на возможность однозначной интерпретации очагов ишемии по сигналу фНАДН без

длительного сканирования с помощью катетеров и без референсной записи. Этот результат может быть полезен для разработки неинвазивных методов анализа состояния донорского сердца после ишемии [24] и для помощи в принятии решений при длительных хирургических операциях на открытом сердце.

Методы

Этические положения

Все экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (опубликованным Национальными институтами здравоохранения, публикация № 85-23, пересмотр 1996 г.). Все процедуры были выполнены в соответствии с Руководством Национальных институтов здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных и были утверждены Институциональной комиссией по уходу и использованию животных Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (протокол № 4 от 4 марта 2021 г.) и Временной комиссией по процедурам содержания и исследования животных Научного центра по жизни Московского физико-технического института (протокол № А2-2012-09-02).

Экспериментальный протокол изоляции и подготовки сердца к перфузии

Эксперимент проводился с использованием восьми крыс линии Wistar. Все животные были анестезированы при помощи установки RWD R500 подачей изофлурана с кислородом для анестезии малых животных и умерщвлены путем цервикальной дислокации, для контроля анестезии использовалось тестирование ноцицептивного рефлекса. Важным аспектом исследования было рациональное использование лабораторных животных, поэтому экспериментальная проверка гипотез проводилась по заранее выбранным протоколам (приведенным в следующих разделах) на минимальном и достаточном количестве животных ($n = 8$). Обоснование составления протоколов и их применение изложены в следующих разделах. Последующие этапы извлечения сердца включали: 1) выполнение разреза от мечевидного отростка до латеральных краев ребер, 2) пересечение ребер по левой и правой передним подмышечным линиям для облегчения торакотомии, 3) поднятие грудной клетки. Эти этапы обеспечивали полный доступ к сердцу. Процедура извлечения сердца завершалась разделением участков полой вены и аорты; после этого сердце промывали оксигенированным раствором солей

Тироде (Sigma-Aldrich Co., США), содержащим гепарин (50 МЕ/мл), и переносили в чашку Петри диаметром 65 мм с тем же раствором. Затем сердце канюлировали (с помощью катетерной иглы с мягкой полимерной оболочкой, размер иглы – 18G) и для дополнительной фиксации сердца на канюле завязывали узел хирургической нитью. Затем сердце подключали к перфузионному контуру с оксигенацией. С момента извлечения сердца до начала перфузии через канюлю проходило не более 10 мин.

Перфузия изолированных сердец

После канюляции сердце перфузировали по методу Лангендорфа. Для этого использовали перфузионную установку, объединяющую перфузионный контур и оптическую систему картирования сердца. Для поддержания температуры жидкости 37 °С использовали термостат Cole-Parmer Polystat Standard (Cole-Parmer Instrument Company, США) и термостазируемую подставку Tokai Hit (Tokai Hit, Япония). Для оксигенации раствора и удаления пузырьков газа из перфузата использовали Oxxygenating Bubbler (Cole-Parmer Instrument Company, США). Подачу газовой смеси (95 % O₂ и 5 % CO₂) в перфузат контролировали с помощью измерителя растворенного кислорода (Cole-Parmer Instrument Company, США). Перистальтический насос Masterflex L/S с насосной головкой Masterflex L/S Easy-Load II (Cole-Parmer Instrument Company, США) прокачивал жидкость как через саму систему перфузии, так и через водяную рубашку для поддержания постоянной температуры перфузата. Объем перфузата был ограничен 50 мл, скорость перфузии – 1 мл/мин. Для дополнительного контроля давления в сердце крысы использовали водяной столб. После 15 минут перфузии в раствор Тироде добавлялся кардиоплегический раствор «Нормакар» (ОАО «КардиоСистемФарма», Россия) в соотношении 1:4 для минимизации механических сокращений и, следовательно, снижения расхода энергии. Для приготовления раствора соли Тироде использовали HEPES (Sigma-Aldrich Co., США), а pH поддерживали на уровне 7,4 на протяжении всего эксперимента.

Система оптического картирования

Оптическое картирование проводилось с использованием установки, состоящей из высокоскоростной электронно-лучевой камеры Andor i-Xon 3 (Andor Technology, Великобритания), УФ-диода LC-L1V5 (Hamamatsu, Япония), длина волны излучения составляла 365 ± 5 нм, оптического микроскопа Olympus MVX-10 MacroView (Olympus Co., Япония). Для регистрации фНАДН была собрана оптическая

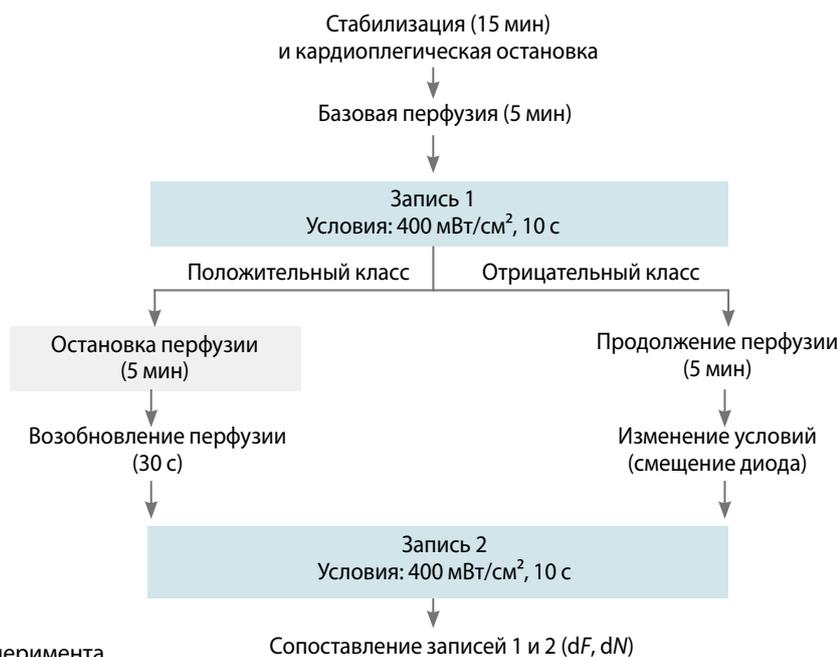


Рис. 1. Схема эксперимента

конфигурация согласно руководству от Olympus. В конфигурации использовались дихроичное зеркало U-MGFPHQ-DM485 (Olympus Co., Япония) и эмиссионный фильтр Chroma ET480/40m (Olympus Co., Япония). Разрешение оптического картирования составляло 256×256 пикселей (биннинг 2×2 пикселя), 5-кратное электронное умножение, частота дискретизации съемки составляла 67 кадров в секунду (время экспозиции $\sim 14,9$ мс). Возбуждающее излучение включалось в начале визуализации с помощью триггера, чтобы минимизировать фотолитз НАДН до начала съемки.

Предварительная обработка оптического картирования

К данным оптического картирования были применены два дополнительных шага программной предварительной обработки. 1. Для устранения небольших механических смещений, вызванных прокачкой жидкости перистальтическим насосом, использовался нежесткий алгоритм компенсации движения (Optimap, <https://cardiacvision.github.io/optimap/>), данный метод опирается на алгоритм отслеживания движения, разработанный Christoph, Luther [25] и использующий реализацию оптического потока Фарнебека с ускорением на графических процессорах [26]. 2. Для снижения шума без размытия изображения и снижения пространственного разрешения использовалась самоконтролируемая сверточная нейронная сеть (SUPPORT) [27]. Этот подход оправдан, поскольку колебания фНАДН в живых клетках

демонстрируют стохастическое поведение [28] и могут быть аппроксимированы гауссовым шумом.

Протокол перфузии для контролируемого изменения фНАДН и потока излучения

Данный протокол использовался в восьми экспериментах и имеет две вариации. В четырех из восьми экспериментов проводился следующий протокол: после 5 мин постоянной перфузии (считая от кардиоплегической остановки) производилась контрольная запись фНАДН (запись 1) при стандартной мощности засветки (~ 400 мВт/см²) длительностью 10 с, после чего перфузия прерывалась на 5 мин путем остановки работы перистальтического насоса. По истечении этого времени перфузия возобновлялась на 30 с, после чего производилась повторная запись фНАДН (запись 2) в аналогичных условиях. Эксперименты, соответствующие данному протоколу, будем называть «положительный класс», поскольку они соответствуют метаболическим изменениям.

В оставшихся четырех экспериментах получение записи 1 было аналогичным, после чего перфузия продолжалась в течение 5 мин без изменения для полного восстановления баланса НАДН/НАД⁺. После этого менялась мощность засветки (до максимальных 500 мВт/см²) за счет контроллера LC-L1V5 (Hamamatsu, Япония) и небольшого произвольного смещения источника излучения без изменения расположения перфузируемого сердца, после чего производилась запись 2. Эксперименты, соответствующие данному протоколу, будем называть «отрицательный класс»,

поскольку он подразумевает изменение dF вследствие неизбежного технического артефакта.

Схема эксперимента для обоих классов схематически представлена на рис. 1.

Оценка изменений dF и dN , математическая модель

Для обоих вариаций протокола перфузии значение dF определялось одинаковым образом. Распределение dF оценивалось путем вычитания первого кадра записи 1 из первого кадра записи 2. Как сказано выше, было записано четыре таких пары записей, в каждом случае dF оценивалась общепринятым способом [11–13]. Для оценки dN использовались остальные кадры записи: последовательность значений фНАДН (отражающее изменение баланса НАДН/НАД⁺ при постоянной скорости фотолиза) в каждом пикселе записи нормировалось на значение фНАДН в первом кадре (обозначим эти значения как $x(t)$, где $x(0) = 1$) и аппроксимировалась экспоненциальным решением (уравнение (1)), подробный вывод которого (для общего случая) приведен в [23]:

$$x(t) = \frac{C}{N+C} + \frac{N}{N+C} e^{-(N+C)t}, \quad (1)$$

где N – искомая скорость фотолиза; C – коэффициент, отражающий активность дегидрогеназ при заданном соотношении НАДН/НАД⁺, анализ которого не входил в задачи исследования.

Значения $x(t)$ отражают нормированные значения фНАДН, где t – номер кадра в записи (от 0 до 671 кадра). Аппроксимация методом наименьших квадратов (Python 3.9, sklearn) позволяла вычислить значение N для каждого пикселя записи фНАДН. Карты N строились для записи 1 и записи 2, после чего вычитались аналогично картам фНАДН. Полученное распределение dN анализировалось на предмет сдвига среднего значения относительно 0 ($dN < 0$ или $dN > 0$). Сдвиг считался значимым, если он превышал 10 % как в случае dN , так и в случае dF .

Экспериментальные данные обрабатывались с использованием программного обеспечения ImageJ, аппроксимация кривых методом наименьших квадратов и методов градиентного спуска, очистка от шумов при помощи нейронной сети и потоковая предобработка записей выполнялись с использованием графического процессора NVIDIA RTX A5000. Согласованность данного метода анализа со статистическими методами анализа также приведена в [23] для экспериментальной выборки аналогичного размера ($n = 8$). Дополнительно использовался двухсторонний U -критерий Манна – Уитни для

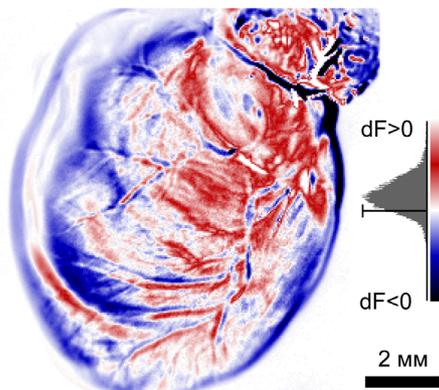
проверки гипотезы о том, что два независимых набора данных, полученных в разных экспериментах, происходят из одной и той же генеральной совокупности (не предполагается, что она подчиняется нормальному распределению). Поскольку до анализа не было оснований предполагать, в какую сторону может сместиться распределение (увеличится или уменьшится уровень признака в одной из групп), использовалась двухсторонняя постановка теста, чувствительная к любому типу сдвига между группами. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$ и статистически незначимыми при $p > 0,05$. Для вычисления статистических показателей использовалась библиотека Scipy (Python 3.9). Все числа приводятся с точностью до второго знака после запятой, значения F и N приведены в относительных единицах флуоресценции и оценочной скорости фотолиза соответственно.

Результаты

По результатам всех восьми экспериментов были вычислены распределения dF и dN для каждой пары записей фНАДН. На рис. 2 показано качественное сравнение двух случаев: когда протокол перфузии подразумевал только возникновение ишемии (рис. 2, А) и когда изменения сводились к перемещению и изменению мощности УФ-диода (технический артефакт, рис. 2, В). На данном рисунке псевдоцветами обозначен знак изменений dF : увеличение фНАДН от записи 1 к записи 2 ($dF > 0$) обозначено красным цветом, снижение показано синим цветом ($dF < 0$). На приведенных изображениях суммарное изменение dF положительно в обоих случаях, но только в одном из них оно отражает возникновение ишемии (по дизайну эксперимента, случай на рис. 2, А). Невозможность надежно различить природу изменений dF визуальным анализом демонстрирует неоднозначность параметра dF как маркера ишемии. Возможность сопоставления записи 2 и записи 1 для каждого случая была достигнута за счет предобработки обеих записей (методы Optimar и SUPPORT).

В обоих представленных случаях наблюдается гетерогенное, но в целом положительное изменение интенсивности флуоресценции ($dF > 0$, преимущественно красные тона). Без дополнительной информации невозможно определить, вызвано ли это увеличение сигнала метаболическим событием (накоплением НАДН вследствие ишемии, рис. 2, А) или является артефактом, связанным с изменением условий освещения (рис. 2, В). Таким образом, качественное сравнение данных рис. 2 наглядно иллюстрирует, что изменение dF само по себе не является однозначным маркером

А Изменение флуоресценции НАДН при остановке перфузии на 5 минут



В Изменение флуоресценции НАДН при смещении источника УФ излучения

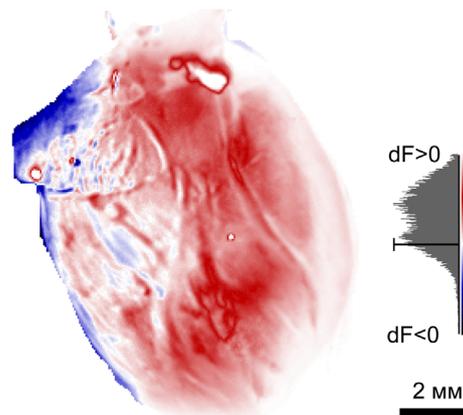


Рис. 2. Качественное сравнение изменений сигнала фНАДН (dF) в двух экспериментальных случаях: А – случай, вызванный индуцированной ишемией (метаболическое событие); В – случай, вызванный изменением условий освещения (технический артефакт). Увеличение интенсивности флуоресценции ($dF > 0$) показано красным, уменьшение ($dF < 0$) – синим. Распределение значений dF показано серой гистограммой (от -1000 до 1000 у.е.), размер масштабной линейки – 2 мм
Примечание. НАДН – никотинамидадениндинуклеотид; фНАДН – флуоресценция НАДН.

ишемии в общем случае. Это подчеркивает необходимость использования дополнительного независимого параметра, который позволил бы разграничить метаболические и технические причины изменения сигнала. Следуя изначальной гипотезе, мы расширили анализ независимой оценкой скорости фотоллиза (dN).

На рис. 3, А показаны примеры сопоставления dF и dN для четырех пар, две пары относятся к положительному классу (верхний ряд), а две пары – к отрицательному классу (нижний ряд). Гистограммы dF и dN для положительного класса подтверждают, что $dF > 0$ в обоих случаях ($dF = 294 \pm 89$ у.е. для положительного класса и $dF = 289 \pm 83$ у.е. для отрицательного класса, $p > 0,05$, $n = 4$), при том что анализ скорости фотоллиза позволяет независимо подтвердить факт, заложенный в планировке эксперимента, – неизменность мощности излучения и взаимного расположения источника и поверхности исследуемого сердца. Значения $dN = 1,31 \pm 1,17$ у.е. не имеют статистически значимых отличий от 0 во всех четырех случаях положительного класса ($p > 0,05$, $n = 4$), а значения dN отрицательного класса ($dN = 17,46 \pm 5,25$ у.е., превышают пороговое значение в 10 % во всех четырех случаях) статистически значимо отличаются для таковых для положительного класса ($p < 0,01$, $n = 4$ в каждой группе).

На рис. 3, В показана классификация всех восьми пар, выполненная при помощи совокупного анализа dN и dF (при анализе заведомо неизвестно, какому классу соответствует данная пара записей). Данный

метод анализа позволил безошибочно ($p > 0,01$, $n = 4$, см. предыдущий абзац) определить, сопровождалось ли изменение флуоресценции ($dF > 0$) изменением условий записи. При этом анализ на основе только значений dF не позволяет классифицировать характер изменений, что приводит к четырем верным и четырем ошибочным попыткам классификации (по дизайну эксперимента весь отрицательный класс привел к $dF > 0$, $p < 0,01$, $n = 4$). Предложенный метод обеспечил разделение классов, в отличие от анализа dF . В табл. 1 также представлены суммированные данные по исходному состоянию сердец и данным анализа.

Обсуждение

Предложенный нами подход преодолевает ключевое ограничение классической фНАДН-визуализации – принципиальную неоднозначность интерпретации сигнала, открывая путь к его использованию в условиях хирургических операций, где орган неизбежно подвергается смещениям. Важным шагом на этом пути является отказ от обязательной референсной записи. Классический подход [11–13], проиллюстрированный также на рис. 2, А, требует наличия записи в исходном, метаболически нормированном состоянии (например, при минимальной концентрации НАДН), что зачастую невыполнимо в клинической реальности, например при оценке донорского сердца, уже перенесшего период тепловой ишемии [24].

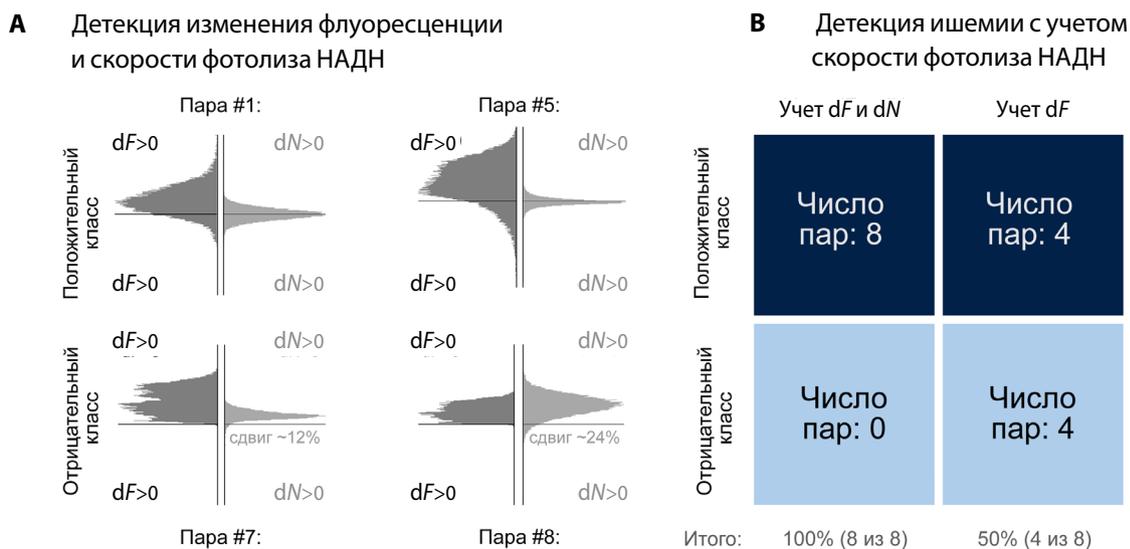


Рис. 3. Двухпараметрический анализ (dF и dN) для классификации изменений сигнала фНАДН: А – примеры совместного распределения dF и dN для четырех пар записей: двух из положительного класса (метаболические изменения, верхний ряд) и двух из отрицательного класса (технические артефакты, нижний ряд). Гистограммы показывают распределения dF (слева) и dN (справа) для каждого случая; В – классификация всех восьми экспериментальных пар по совокупности параметров dF и dN . *Примечание.* НАДН – никотинамидадениндинуклеотид; фНАДН – флуоресценция НАДН.

Основной результат нашего исследования заключается в демонстрации того, что комбинированный анализ относительного изменения флуоресценции НАДН (dF) и скорости фотолиза (dN) позволяет надежно дифференцировать метаболически обусловленное изменение сигнала (ишемию) от артефакта, вызванного изменением условий освещения. Наш метод, основанный на анализе скорости фотолиза в рамках одной короткой записи [23], представляет собой значительный шаг к безреференсному анализу. Мы проверили, что параметр N , в отличие от параметра F , зависит исключительно от потока падающих фотонов и не зависит от концентрации НАДН. Таким образом, даже по одной записи можно оценить условия освеще-

ния, а сравнительный анализ двух состояний позволяет однозначно атрибутировать причину изменения dF .

С методологической точки зрения такой подход комбинирует анализ кинетики фотолиза НАДН с традиционной флуоресцентной визуализацией в реальном времени. Это является принципиальным отличием от предыдущих исследований, например, использующих метод enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP) [16, 17, 21, 22]. Исследования ED-FRAP анализируют восстановление флуоресценции после периода фотообесцвечивания и требуют катетерного сканирования, мы используем только более короткую фазу фотолиза. Стоит отметить исследование [22], положившее начало методу ED-FRAP, – часть записей демонстрируют фазу фотолиза

Табл. 1. Исходные характеристики

Эксперимент	Масса животного, г	ЧСС после начала перфузии, уд./мин	Размер сердца продольный, см	Размер сердца поперечный, см
1. Крыса Wistar, самец	211	235	1,32	0,88
2. Крыса Wistar, самец	220	230	1,34	0,89
3. Крыса Wistar, самец	193	255	1,23	0,86
4. Крыса Wistar, самец	201	290	1,26	0,84
5. Крыса Wistar, самец	182	265	1,08	0,81
6. Крыса Wistar, самец	169	315	1,19	0,83
7. Крыса Wistar, самец	199	248	1,24	0,88
8. Крыса Wistar, самец	190	210	1,29	0,95

Примечание. ЧСС – частота сердечных сокращений.

достаточно большой длительности, аналогично нашему исследованию, однако авторами не был предложен способ для анализа таких сигналов. Наш подход кардинально сокращает время сбора данных: сбор данных со всей видимой поверхности сердца занимает 10 с против 100 с на 7 мм² участке сердца в [16]. В совокупности с высокооптимизированной предобработкой и аппроксимацией (общее время вычислений около 40 с для карты 256×256 пикселей, порядка 30 с – для предобработки записи) наш подход приближается к требованиям оперативного принятия решений в ходе хирургического вмешательства. Результаты данного пилотного исследования, в частности величина наблюдаемого эффекта и вариабельность параметров, предоставляют необходимые данные для планирования размера выборки в будущих полноценных валидационных исследованиях.

Ограничения

В данном исследовании мы валидировали метод, изменяя взаимное расположение источника излучения и ткани, но сохраняли неизменным взаимное расположение сердца и детектора флуоресценции. Поскольку скорость фотолита N зависит от потока фотонов, падающих на ткань, можно ожидать, что метод будет работать и при изменении положения камеры, однако наглядное сравнение данных (как на рис. 2, В) потребует сегментации сердца на полученном изображении, что может быть дальнейшим направлением разработки. Диапазон изменений N в данном исследовании составил $17,46 \pm 5,25$ (около 20 %), что гарантирует применимость метода в данном диапазоне, однако он может быть уточнен в последующих исследованиях. Кроме того, наблюдаемое в отрицательном классе неполное совпадение распределений dF и dN указывает на более сложную зависимость интенсивности флуоресценции от потока фотонов, чем предполагалось в исходной математической модели. Предложенное в данной

работе сопоставление анализа фНАДН и N может помочь в уточнении этой зависимости и модели.

В заключение можно отметить следующее. Наша работа демонстрирует, что фотолит (фотообесцвечивание) НАДН, традиционно считавшийся артефактом флуоресцентного анализа [29], может являться ценным независимым источником информации в задачах по оценке ишемии в изолированном сердце. Такой анализ позволяет устранить главное препятствие на пути фНАДН-визуализации к клинической практике – уязвимость к любым изменениям взаимного расположения поверхности сердца и источника излучения. Дальнейшее развитие этого подхода создает основу для неинвазивного оптического мониторинга метаболического состояния миокарда практически в реальном времени, что крайне востребовано как при проведении длительных операций на открытом сердце (например, аортокоронарном шунтировании), так и для оценки жизнеспособности донорских сердец во время транспортировки [30].

Заключение

В данной работе предложен и экспериментально валидирован на модели изолированного сердца крысы двухпараметрический подход, комбинирующий анализ интенсивности флуоресценции молекул НАДН и скорости сопутствующего фотолита НАДН. Данный подход позволяет однозначно дифференцировать метаболическое накопление НАДН при ишемии от артефактов, вызванных изменением условий освещения. Метод, основанный на анализе кинетики фотолита в течение 10 с и быстрой математической обработке, устраняет необходимость в референсной записи и длительном сканировании, открывая перспективы для разработки систем неинвазивного мониторинга метаболического состояния миокарда в реальном времени в кардиохирургической практике.

Список литературы / References

1. Wallace D.C. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1405-1412. PMID: 23543062; PMCID: PMC3614529. <https://doi.org/10.1172/JCI61398>
2. Song A., Zhao N., Hilpert D.C., Perry C., Baur J.A., Wallace D.C., Schaefer P.M. Visualizing subcellular changes in the NAD(H) pool size versus redox state using fluorescence lifetime imaging microscopy of NADH. *Commun Biol.* 2024;7:428. PMID: 38594590; PMCID: PMC11004000. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06123-7>
3. Katsyuba E., Romani M., Hofer D., Auwerx J. NAD⁺ homeostasis in health and disease. *Nat Metab.* 2020;2(1):9-31. PMID: 32694684. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0161-5>
4. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(2):C615-40. PMID: 16943239. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2006>
5. Niederschweiberer M.A., Schaefer P.M., Singh L.N., Lausser L., Bhosale D., Hesse R., Calzia E., Kestler H.A., Rueck A., Wallace D.C., von Einem B., von Arnim C.A.F. NADH Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Reveals Selective Mitochondrial Dysfunction in Neurons Overexpressing Alzheimer's Disease-Related Proteins. *Front Mol Biosci.* 2021;8:671274. PMID: 34195227; PMCID: PMC8236706. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671274>

6. Kim J., DeBerardinis R.J. Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer. *Cell Metab.* 2019;30(3):434-446. PMID: 31484055; PMCID: PMC6730674. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.013>
7. CHANCE B. Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments. *Science.* 1954;120(3124):767-75. PMID: 13216168. <https://doi.org/10.1126/science.120.3124.767>
8. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem.* 1979;254(11):4764-71. PMID: 220260.
9. Vergen J., Hecht C., Zholudeva L.V., Marquardt M.M., Hallworth R., Nichols M.G. Metabolic imaging using two-photon excited NADH intensity and fluorescence lifetime imaging. *Microsc Microanal.* 2012;18(4):761-70. PMID: 22832200; PMCID: PMC3842212. <https://doi.org/10.1017/S1431927612000529>
10. Lee P., Yan P., Ewart P., Kohl P., Loew L.M., Bollensdorff C. Simultaneous measurement and modulation of multiple physiological parameters in the isolated heart using optical techniques. *Pflugers Arch.* 2012;464(4):403-14. PMID: 22886365; PMCID: PMC3495582. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1135-6>
11. Swift L., Martell B., Khatri V., Arutunyan A., Sarvazyan N., Kay M. Controlled regional hypoperfusion in Langendorff heart preparations. *Physiol Meas.* 2008;29(2):269-79. PMID: 18256457; PMCID: PMC3019578. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/29/2/009>
12. Ince C., Vink H., Wieringa P.A., Giezeman M., Spaan J.A. Heterogeneous NADH fluorescence during post-anoxic reactive hyperemia in saline perfused rat heart. *Adv Exp Med Biol.* 1990;277:477-82. PMID: 2096651. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8181-5_53
13. Ince C., Ashruf J.F., Avontuur J.A., Wieringa P.A., Spaan J.A., Bruining H.A. Heterogeneity of the hypoxic state in rat heart is determined at capillary level. *Am J Physiol.* 1993;264(2 Pt 2):H294-301. PMID: 8447446. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.2.H294>
14. Efimov I.R., Nikolski V.P., Salama G. Optical imaging of the heart. *Circ Res.* 2004;95(1):21-33. PMID: 15242982. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130529.18016.35>
15. George S.A., Efimov I.R. Optocardiography: A Review of its Past, Present and Future. *Curr Opin Biomed Eng.* 2019;9:74-80. PMID: 31803858; PMCID: PMC6892455. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.03.001>
16. Moreno A., Kuzmiak-Glancy S., Jaimes R. Rd, Kay M.W. Enzyme-dependent fluorescence recovery of NADH after photobleaching to assess dehydrogenase activity of isolated perfused hearts. *Sci Rep.* 2017;7:45744. PMID: 28361886; PMCID: PMC5374639. <https://doi.org/10.1038/srep45744>
17. Kay M., Moreno A., Jaimes R. (2022). Enzyme-dependent fluorescence recovery of NADH after photobleaching to assess dehydrogenase activity of living tissues. U.S. Patent No. 11,445,950. 20 Sep. 2022.
18. Mercader M., Swift L., Sood S., Asfour H., Kay M., Sarvazyan N. Use of endogenous NADH fluorescence for real-time in situ visualization of epicardial radiofrequency ablation lesions and gaps. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;10;302. PMID: 22408016; PMCID: PMC3362111. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01141.2011>
19. George S.A., Lin Z., Efimov I.R. Simultaneous triple-parametric optical mapping of transmembrane potential, intracellular calcium and NADH for cardiac physiology assessment. *Commun Biol.* 2022;5(1):319. PMID: 35388167; PMCID: PMC8987030. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03279-y>
20. Chi H., Bhosale G., Duchon M.R. Assessing the Redox Status of Mitochondria Through the NADH/FAD2+ Ratio in Intact Cells. *Methods Mol Biol.* 2022;2497:313-318. PMID: 35771452. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2309-1_21
21. Joubert F., Fales H.M., Wen H., Combs C.A., Balaban R.S. NADH enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP): applications to enzyme and mitochondrial reaction kinetics, in vitro. *Biophys J.* 2004;86(1 Pt 1):629-45. PMID: 14695307; PMCID: PMC1303832. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74141-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74141-7)
22. Combs C.A., Balaban R.S. Direct imaging of dehydrogenase activity within living cells using enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP). *Biophys J.* 2001;80(4):2018-28. PMID: 11259315; PMCID: PMC1301391. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76172-3)
23. Tselaya V.A., Slotvitsky M.M., Medvedev M.S., Pashintsev G.S., Kachan V.S., Romanova S.A., Agladze K.I. Beyond intensity imaging: Dissipative equilibrium of NADH/NAD+ as a metabolic response for ischemic response in cardiac tissue. *Research Square* [Preprint]. Posted 2025 Jul 21. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7159262/v1>
24. Marasco S.F., Kras A., Schulberg E., Vale M., Lee G.A. Impact of warm ischemia time on survival after heart transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44(5):1385-9. PMID: 22664020. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.12.075>
25. Christoph J., Luther S. Marker-Free Tracking for Motion Artifact Compensation and Deformation Measurements in Optical Mapping Videos of Contracting Hearts. *Front Physiol.* 2018;9:1483. PMID: 30450053; PMCID: PMC6224482. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01483>
26. Lebert J., Ravi N., Kensah G., Christoph J. Real-Time Optical Mapping of Contracting Cardiac Tissues With GPU-Accelerated Numerical Motion Tracking. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:787627. PMID: 35686036; PMCID: PMC9172765. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.787627>
27. Eom M., Han S., Park P., Kim G., Cho E.S., Sim J., Lee K.H., Kim S., Tian H., Böhm U.L., Lowet E., Tseng H.A., Choi J., Lucia S.E., Ryu S.H., Rózsa M., Chang S., Kim P., Han X., Piatkevich K.D., Choi M., Kim C.H., Cohen A.E., Chang J.B., Yoon Y.G. Statistically unbiased prediction enables accurate denoising of voltage imaging data. *Nat Methods.* 2023;20(10):1581-1592. PMID: 37723246; PMCID: PMC10555843. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02005-8>
28. Blinova K., Combs C., Kellman P., Balaban R.S. Fluctuation analysis of mitochondrial NADH fluorescence signals in confocal and two-photon microscopy images of living cardiac myocytes. *J Microsc.* 2004;213(1):70-5. PMID: 14678514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2004.01278.x>
29. Demchenko A.P. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods Appl Fluoresc.* 2020;8(2):022001. PMID: 32028269. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365>
30. Mamedov A., Gečys D., Jakuška P., Treinys R., Narauskaitė D., Aitaliyev S., Rumbinaitė E., Karčiauskas D., Benetis R., Stankevičius E. How different cardioplegic solutions influence genes expression and cytokine response in an immature rat heart model of ischemia/reperfusion? *PLoS One.* 2025;20(7):e0329010. PMID: 40729334; PMCID: PMC12306747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0329010>